



TITLE:

リン酸化によるタンパク質液 - 液  
相分離制御機構とその分裂期染色  
体構築における役割の解明(  
Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

山崎, 啓也

---

CITATION:

山崎, 啓也. リン酸化によるタンパク質液 - 液相分離制御機構とその分裂期染色体構築における役割の解明. 京都大学, 2020, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22594>

RIGHT:

許諾条件により全文は2022-07-19に公開; 学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2021-03-01に公開; 出典  
: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140295> © 2020. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0

(続紙 1 )

京都大学	博士（生命科学）	氏名	山崎 啓也
論文題目	リン酸化によるタンパク質液-液相分離制御機構と その分裂期染色体構築における役割の解明		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>タンパク質リン酸化は主要な翻訳後修飾の1つで、細胞分化、発生、細胞周期など様々な細胞内現象の制御で重要な役割を果たしている。リン酸基の付加による負電荷の増加は、タンパク質の局所的内部エネルギーを変化させ、ひいては局所的もしくはアロステリックな高次構造変化を惹起する。多くのリン酸化されたタンパク質においてこのような「立体構造への効果」がみられる一方で、特定の高次構造を持たない天然変性領域（IDR）も多くのリン酸化を受けることが知られている。しかしながら、その構造的側面および細胞内での機能的側面に関しては、不明な点が多い。本研究は、細胞分裂期移行時における大規模なリン酸化・脱リン酸化が細胞内構造の大規模な再編において果たす役割を、リン酸化部位の非構造的性に注目して解明することを目的とする。分裂期に進行する可逆的な細胞内小器官の崩壊・再構築や染色体の凝集・分配・脱凝縮は、1対1の相互作用の変化ではなく、分子の集合状態の変化、すなわち液-液相分離のようなメカニズムで進行すると考えられており、ここでは、リン酸化がその制御に関与している可能性を検証した。</p> <p>まず、タンデムマスタグを用いた比較定量質量分析により、分裂期移行時のリン酸化・脱リン酸化部位を網羅的に同定した。IDR 予測から、分裂期脱リン酸化はリン酸化より非構造領域に起こりやすいことが示された。さらに、Gene ontology 解析やタンパク質間相互作用解析を組み合わせることで、分裂期リン酸化によって液-液相分離が制御されている可能性がある染色体関連タンパク質や RNA 関連タンパク質を抽出した。増殖細胞マーカーとして知られ、分裂期染色体に局在する Ki-67 は、特に多くのリン酸化部位を IDR に持っていた。</p> <p>次に、Ki-67 を対象として、分裂期リン酸化による液-液相分離の制御と分裂期染色体構築における役割を明らかにすることを目指した。Ki-67 は分子の大部分が IDR であり、中央部に 16 個のリピート配列からなるリピートドメインを持つ。リン酸化質量分析では、このリピートドメインに 64 個の分裂期特異的リン酸化が検出された。これらのリン酸化部位の変異体を用いた解析により、Ki-67 が分裂期リン酸化に依存して、染色体周縁部へ局在し、染色体の異常な凝集を防ぐことが明らかになった。Ki-67 が塩による処理で可逆的に染色体周縁部から非局在化すること、分裂期リン酸化依存的に染色体周縁部で速い分子交換を示すことから、染色体上で液-液相分離することで染色体周縁部を構築していると考えられる。精製タンパク質を用いた <i>in vitro</i> 液滴アッセイにより、リン酸化模倣変異依存的にリピートドメインの液-液相分離能が上昇することが示された。DNA ビーズと精製タンパク質を用いて、ビーズ周辺に染色体周縁部を再構成する実験系を構築し、液-液相分離の分子機構を調べたところ、リピートドメインのリン酸化と DNA 結合能を有する LR ドメインが染色体周縁部様の構造構築に重要であることが分かった。</p> <p>以上の結果は、染色体周縁部における Ki-67 の液-液相分離が、リピートドメインのリン酸化によって促進されることを示すものであり、Ki-67 が染色体の異常な凝集を防ぐインシュレーターとして機能していること示唆するものである。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、タンパク質の液-液相分離が分裂期染色体の高次構造構築において果たす役割を明らかにした論文である。近年、タンパク質や核酸の液-液相分離が細胞内の非膜小器官の構築やその構造変化、さらには機能に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。染色体関連タンパク質でも、HP1 やリンカーヒストンなどで液-液相分離現象がみられ、染色体の高次構造構築や転写制御などでの重要性が示唆されている。このような流れの中で本論文は、細胞内における液-液相分離の「制御」機構に着目した。一般的に相分離は、温度、pH、塩（種や濃度）、共存分子種、等の要因により大きく影響されるが、実際の細胞内では、リン酸化やメチル化などのタンパク質翻訳後修飾により制御される可能性が考えられる。実際に、*in vitro* の実験系ではリン酸化依存的な相分離の進行例が報告されている一方で、細胞内におけるリン酸化と液-液相分離の関係に関しては報告例がなく、まだ不明な点が多い。そこで本論文では、分裂期におけるタンパク質リン酸化と染色体高次構造変化との関係性を、「リン酸化による液-液相分離の制御」という新しい観点から理解しようとする試みがなされた。

細胞分裂期には、細胞内の多くのタンパク質が CDK1 などのキナーゼによりリン酸化され、その部位は一万箇所以上になると報告されている。しかしながらその全てが、タンパク質の高次構造変化や活性部位の構造変化を介してその機能を制御しているかどうかに関しては、まだ理解が進んでいない。本論文では、まず定量質量分析を用いて、分裂期にリン酸化が大きく亢進するリン酸化部位を網羅的に同定し、バイオインフォマティクス手法と組み合わせることで、これらのリン酸化が非構造領域に多く存在することを明らかにした。このことは、分裂期リン酸化が、タンパク質の高次構造変化のみならず、非構造領域を介した液-液相分離の制御に関与していることを示唆する。さらに、Ki-67 タンパク質が 100 箇所近くのリン酸化を受けることに着目し、以下の成果を得た。i) Ki-67 の非構造領域は *in vitro* で液-液相分離を示し、この相分離は、導入したリン酸化模倣変異の数に依存して大きく亢進する。ii) Ki-67 は分裂期染色体の周縁部に局在し、染色体の正常な凝縮に必須である。iii) 分裂期染色体周縁部の形成には、非構造領域のリン酸化が必要である。iv) 染色体周縁部形成における Ki-67 の効果は、リン酸化の数に依存する。以上の *in vitro* および *in vivo* の実験結果は、Ki-67 の非構造領域における分裂期リン酸化が、液-液相分離を介して染色体高次構造を制御していることを示唆するものである。またこの成果は、染色体凝縮・分配の新たな基盤原理を提示するとともに、細胞内における様々な構造再編が、リン酸化による液-液相分離制御を介して進行することを示唆するものである。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、生物物理分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見もしくは概念等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。

よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文としての価値あるものと認めた。更に令和2年1月31日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 平成 年 月 日